N-ACETYL-BETA-GLUCOSAMINIDASE-AKTIVITÄT IM URIN VON PATIENTEN MIT DIABETES MELLITUS. BEZIEHUNG ZUR DIABETISCHEN RETINOPATHIE.

Rainer Assfalg

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0044

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof.Dr.N.Zöllner

N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität im Urin von Patienten mit Diabetes mellitus. Beziehung zur diabetischen Retinopathie.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
der Doktorwürde in der Zahnmedizin an
der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von

Rainer Assfalg
Ravensburg
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.F.D.Goebel
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.N.Zöllner
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.1984

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	6
2.	PATIENTEN UND METHODEN	
2.1.	Patientenauswahl	8
2.2.	Aktivitätsmessung der N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase	9
2.3.	Herstellung und Aufbewahrung der Versuchssubstanzen	9
2.4.	Ermittlung der Standardkurve	10
2.5.	Stabilität des Endprodukts	10
2.6.	Fluorimetrische Messung und Auswertung	10
2.7.	N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Enzym=aktivität bezogen auf die in 24 Std. gesammelte Urinmenge	12
2.8.	Weitere gemessene Parameter und Bestimmungsmethoden	13
3.	RESULTATE	
3.1.	N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase - Aktivitätsunterschiede bei weiblichen und männlichen Patienten	14
3.2.	Korrelation zwischen N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase und anderen Parametern	14
3.3.	Unterschiede der N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität bei Diabeti=kern mit verschiedenen Therapieformen	15
3.4.	N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Akti=vität, Diabetesdauer und Harnstoff-N	15

3.5. N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität in Beziehung zu den HbA_1-Werten 16

3.6. Schweregrad der diabetischen Retinopathie in Beziehung zu anderen Parametern 17

4. DISKUSSION 18

5. ZUSAMMENFASSUNG 22

6. STANDARDKURVE 24

7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN 25

8. LITERATURVERZEICHNIS 42

9. ANHANG 50

1. Einleitung

Ein Merkmal der diabetischen Mikroangiopathie ist die Verdickung der kapillaren Basalmembran. Diese Verdickung ist Folge einer Akkumulation von Glycoproteinen und Mucopolysacchariden. Sie resultiert aus einer Störung des Verhaltens zwischen Synthese und Abbau dieser Substanzen. Über eine erhöhte Aktivität von Enzymen der Glycoproteinsynthese in der Niere von diabetischen Patienten wurde berichtet (7). Der Catabolismus von Glycoproteinen und Mucopolysacchariden findet in den Lysosomen statt. Die N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase (E.C.3.2.1 30) ist ein lysosomales Enzym, das für den Abbau von Glycoproteinen und Mucopolysacchariden mitverantwortlich ist.
Substrat sind Glucosamine, bedeutsamer Bestandteil dieser Substanzen. Eine Verminderung der intrazellulären Aktivität des Enzyms könnte zu einer erhöhten Einlagerung von Glycoproteinen und Mucopolysacchariden in den Mikrogefäßen von diabetischen Patienten führen (20,2).

Die N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase (NAGA) wird, wie die meisten lysosomalen Enzyme, von den Zellen einiger Gewebe freigesetzt. Das Enzym kann bei Tier und Mensch im Blut und im Urin gemessen werden (9). Ob das Enzym durch glomeruläre Filtration aus dem Blutstrom oder durch Freisetzung seitens glomerulärer oder tubulärer Zellen in den Harn gelangt, wurde bisher nicht geklärt.

Belfiore und Mitarbeiter (4) untersuchten 73 Patienten mit Diabetes mellitus und beobachteten im Vergleich zu ge-

sunden Kontrollpersonen eine signifikante Erhöhung der Serum-Aktivität der NAGA. Eine Korrelation der Enzymaktivität zum Schweregrad der vaskulären Komplikationen der diabetischen Erkrankung (Mikroangiopathie und Makroangiopathie) und den Blutzuckerwerten schien zu bestehen.

Diese Beobachtungen konnten in einer Untersuchung von Miller und Mitarbeitern nicht bestätigt werden. Diese Untersucher fanden keine Korrelation zwischen der Aktivität dieses lysosomalen Enzyms und der Höhe der Hyperglykämie (26).

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung fanden Pitkänen und Mitarbeiter hingegen eine positive Korrelation zwischen der Höhe der NAGA-Aktivität im Serum und den Blutzuckerkonzentrationen (30). Außerdem war die Aktivität dieses Enzyms bei Diabetikern mit einer Retinopathie höher als bei diabetischen Patienten ohne Retinopathie.

Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten mit experimentell induziertem Diabetes mellitus haben gezeigt, daß die Aktivität der NAGA im Serum und im Urin bei Diabetes erhöht ist. Die Aktivität in der Niere vermindert sich hingegen, wenn der experimentell induzierte Diabetes bei diesen Tieren sich entwickelt (15,27).

Die NAGA ist in allen Geweben der Säugetiere zu finden. Die höchsten Aktivitäten findet man in den Lysosomen der Nierenzellen (10).
Eine erhöhte NAGA-Aktivität im Urin wurde während einiger Nierenerkrankungen wie z.B. akute und chronische Glomerulonephritis, nephrotisches Syndrom unterschiedlicher Ursache und akutes Nierenversagen bei Schock festgestellt (24,12, 23,37,25).
Nach Nierentransplantation wurde beobachtet, daß ein Anstieg der Enzymaktivität das baldige Abstoßen des Transplantates

ankündigt (32,38,12,28,34).
Die Aktivität des Enzyms wird durch eine sehr sensitive fluorimetrische Methode untersucht. Diese wurde kürzlich zur Aktivitätsmessung im Urin modifiziert (34).

Ziel unserer Untersuchung war es, die NAGA-Aktivität im Urin von Diabetikern und stoffwechselgesunden Probanden zu vergleichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Beziehung der Urinenzymaktivität zu Diabetes-Typ und Dauer, diabetischer Retinopathie und den Blutzuckerwerten besteht. Bestimmt wurde bei den diabetischen Patienten auch der prozentuale Anteil des glycosilierten Haemoglobins (HbA_1), das einen Langzeitparameter der Kontrolle der Stoffwechsellage des Diabetikers darstellt (19).
Es war deswegen von großem Interesse zu prüfen, ob eine NAGA-Aktivität im Urin von diabetischen Patienten mit der Höhe der HbA_1 Werte in Beziehung steht, da von einigen Autoren über eine Korrelation der NAGA-Aktivität zu Blutzuckerkonzentrationen bei Diabetikern berichtet wurde (4,30).

2.Patienten und Methoden

2.1. Patientenauswahl

Untersucht wurden Patienten der Medizinischen Poliklinik der Universität München, die teils ambulant, teils stationär in Behandlung waren.
Die Referenzwerte stammen von Studenten und von stoffwechselgesunden Patienten der Poliklinik.
Insgesamt wurden im Urin NAGA-Werte von 93 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 56 $\pm$ 15 Jahren ermittelt.
Hiervon waren 61 wegen Diabetes mellitus in Behandlung.
Ihr Durchschnittsalter betrug 61 $\pm$ 12 Jahre (männlich 28; Alter 58 $\pm$ 13, weiblich 33: Alter 63 $\pm$ 11).

Die Referenzwerte wurden von 21 nierengesunden, nicht an Diabetes erkrankten Probanden geliefert, mit einem Durchschnittsalter von 43 ± 17.
Ferner wurden noch die NAGA-Werte von 11 nierenkranken Patienten mit teilweise hochgradiger Niereninsuffizienz gemessen. Ihr Durchschnittsalter betrug 57 ± 16 Jahre.
Eine Übersicht über die Patienten vermittelt Tab.1.

2.2. Aktivitätsmessung der N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase

Die Aktivität der NAGA wurde nach der fluorimetrischen Methode von Dance et al. gemessen (11).
Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-ß-D-glucopyranoside (MUG) in einer Konzentration von 1 mmol/l.
0,1 ml Urin wurden in 0,9 ml Citrat/Phosphatpuffer (pH 4,5) gelöst. Das Gemisch wurde 5 min.bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,0 ml MUG mit einer Konzentration von 2 mmol/l gestartet und nach 30 min. durch Zugabe von 3,0 ml Glycin/NaCl Puffer (0,5 M, pH 10,4) gestoppt. Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde am Fluorimeter bei R (Excitation) 360 nm und (Emission) 440 nm gemessen.

2.3. Herstellung und Aufbewahrung der Versuchssubstanzen

Die Puffer wurden jede Woche frisch angesetzt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Das Substrat (MUG) wurde vor jeder Messung frisch angesetzt. Die Urine wurden als 24 Std.Urine gesammelt (von 7.oo Uhr- 7.00 Uhr) und ein Aliquot nach Mischen innerhalb einer Stunde nach Abgabe bei -80°C tiefgefroren. Als Standardwert oder Bezugswert diente der Urin eines gesunden Probanden. Der Urin wurde in kleinen Portionen

tiefgefroren und lief bei jeder Messung als Bezugspunkt mit, um Tagesschwankungen auszuschalten. Am Anfang einer jeden Meßreihe wurde die Transmission eines Leerwertes (2 ml Citrat/Phosphat-Puffer + 3 ml Glycin/NaCl - Puffer) am Fluorimeter auf 0 gestellt.

2.4. Ermittlung der Standardkurve

Zur Ermittlung der Standardkurve (siehe Abbildung 1) wurde 4-Methylumbelliferon in verschiedenen Konzentrationen angesetzt und durchgemessen. Die Linearität der Standardkurve ist bis zu einer Konzentration von 5 nmol/ml gegeben. Die Konzentrationsgrenzen (1-5 nmol/ml) wurden vorher ausgetestet.

2.5. Stabilität des Endprodukts

Nach dem Stoppen der Reaktion mit 3 ml Glycin/NaCl-Puffer wurden die Reaktionsgemische fluorimetrisch gemessen und dann bei $4^{o}C$ im Kühlschrank aufbewahrt. Noch nach mehreren Tagen ließen sich exakt die gleichen Endergebnisse wie kurz nach Beendigung der Reaktion ermitteln. Hieraus folgert, daß das Endprodukt stabil bleibt und eine sofortige oder etwas spätere fluorimetrische Messung keinen Einfluß auf die Ergebnisse hat. Trotzdem sind alle Endergebnisse innerhalb einer Stunde nach dem Stoppen der Reaktion gemessen worden.

2.6. Fluorimetrische Messung und Auswertung

Gemessen wurde in einer Küvette mit der Schichtdicke 1 cm. Es wurde für alle zu messenden Proben einer Versuchsreihe nur 1 Küvette benutzt, da festzustellen war,

daß durch das Verwenden von mehreren Küvetten eine nicht unerhebliche Meßungenauigkeit zustande kommt. Dies ist durch die sehr unterschiedliche eigene Lichtstreuung der Küvetten im Fluorimeter bedingt. Es wurde festgestellt, daß die durch Verwendung nur einer Küvette entstehende Meßungenauigkeit vernachlässigbar klein ist. Hierzu trug auch das von uns praktizierte aufwendige Meßverfahren bei. Die gefüllte Küvette wurde mit einer Einmalpipette vom Typ "Pasteur" leergesaugt. Dann wurde mit einer neuen Pasteurpipette die neue Probe eingefüllt, wieder herausgesaugt und verworfen. Nun wurde von dem zu bestimmenden Urin nochmals eine Urinprobe eingefüllt, erst dann wurde die entsprechende Transmission (T) abgelesen. Von allen Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Meßunterschiede unter der jeweiligen Probe waren denkbar gering. Die 3 Werte wurden gemittelt und anhand der Standardkurve die zu T gehörige Konzentration in nmol/ml abgelesen. Gemessen wurde die Transmission jedoch in einem Gemisch von insgesamt 5 ml. Folglich wurde die Konzentration mit dem Faktor 5 multipliziert und die NAGA nach folgender Formel berechnet:

$$\text{NAGA} = \frac{c}{h \times \text{Kreatininkon.}}$$

c = die auf der Standardkurve zu T gehörige Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor 5 multipliziert.

h = Std. (Bei unseren Versuchen wurde 30 min. inkubiert. Folglich muß "c" mit dem Faktor 2 multipliziert werden).

Kreatininkonzentration:

Hier wird die Kreatininkonzentration im 24-Std.Urin in mg/100ml (mg%)
eingesetzt, so daß sich letztendlich folgende Bezeichnung ergibt:

$$NAGA = nmol \times h^{-1} \times mg\ Kreatinin^{-1}$$

Die Kreatininwerte wurden mit dem Kreatininbestimmungskit von Boehringer, Mannheim bestimmt (35). Urin wurde 1 zu 49 mit aqua dest.verdünnt.

2.7. N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Enzymaktivität bezogen auf die in 24 Std.gesammelte Urinmenge

Die NAGA-Enzymaktivität wurde auch auf die in 24 Std.gesammelte Urinmenge bezogen.

In diesem Fall wurde die NAGA nach folgender Formel berechnet:

$$NAGA = \frac{c}{h} \cdot V$$

c = die auf der Standardkurve zu T gehörige Konzentration in nmol/ml.

h = 1 Std.; inkubiert wurde 30 min.d.h.dieser Wert muß durch 2 geteilt werden.

V = die in 24 Std.ausgeschiedene Urinmenge in ml.

hieraus ergibt sich folgende Benennung:

NAGA = nmol/h/ml Urin

Dieses Verfahren ist etwas aufwendig, da von jedem Patienten der 24-Std.Urin (die Mengenanalyse) benötigt wird. Dies setzt eine hohe Kooperationsbereitschaft des Patienten voraus. In unseren Tests mußten wir feststellen, daß dieses Verfahren keinerlei Vorteile gegenüber der altbewährten Methode von Dance et al. (11) erbringt. Die Korrelation der NAGA-Aktivität bezogen auf Urinkreatininkonzentration zur NAGA-Aktivität bezogen auf 24-Std.Urinmenge war hoch signifikant. ($p < 0,001$)

Auf Grund dieser Ergebnisse und Erkenntnisse werteten wir ausschließlich die Resultate der auf Urinkreatinin bezogenen NAGA-Aktivitätsmessungen aus.

2.8. Weitere gemessene Parameter und Bestimmungsmethoden

Von den Patienten mit Diabetes mellitus wurden noch folgende Parameter bestimmt:

- Blutzuckerkonzentration mit der Hexokinase-Methode (Kit der Fa.Boehringer,Mannheim),
- Serumkreatinin colorimetrisch (Kit der Fa.Boehringer,Mannheim),
- Serum Harnstoff-N enzymatisch (Kit der Fa.Boehringer,Mannheim),
- Eiweiß im 24-Std.Urin nach der Biuret-Methode,
- HbA_1 mit der Mikrosäulentechnik (Quick-Sep^R, Panchem GmbH. Klein-Wallstadt),
- Klassifizierung der diabetischen Retinopathie durch Funduskopie nach Ballentyne (3).
- Für die statistischen Berechnungen wurde ein Hewlett-Packard Calculator Modell 10 verwendet,sowie die von der Firma empfohlenen Programme (unpaired t-Test,Korrelationskoeffizient)

3.Resultate:

3.1. N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase, Aktivitätsunterschiede bei weiblichen und männlichen Patienten

Tabelle 2 zeigt die Resultate der NAGA-Aktivitätsmessung im 24-Stunden-Urin von Normalpersonen, diabetischen Patienten und Patienten mit Niereninsuffizienz. In der Kontrollgruppe wiesen weibliche gegenüber männlichen "Probanden" durchschnittlich etwas höhere Urin-NAGA Aktivitäten auf. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Aktivität dieses Enzyms im Urin liegt sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen diabetischen Patienten signifikant höher als bei Gesunden. Die höchsten NAGA-Aktivitäten wurden im Urin von Patienten mit Niereninsuffizienz gemessen.Die NAGA-Aktivität im Urin von niereninsuffizienten Patienten war gegenüber der von Normalpersonen signifikant erhöht. Ebenso signifikant war der Unterschied zwischen den bei diabetischen Patienten gemessenen NAGA-Konzentrationen und niereninsuffizienten Patienten (Tab.2).

3.2. Korrelation zwischen N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase und anderen Parametern

Ferner wurden lineare Korrelationen zwischen der NAGA-Aktivität und anderen in unserem Patientenkollektiv gemessenen Parametern geprüft (Tab.3). Eine signifikante Korrelation ergab sich zwischen NAGA-Aktivität und diabetischer Retinopathie. Keine statistisch signifikante Korrelation konnte hingegen mit Blutzucker, HbA_1-Werten, Harnstoff-N, Serum-Kreatinin, Diabetesdauer und Lebensalter festgestellt werden.
Wenn man die NAGA-Aktivität in Abhängigkeit vom Schweregrad der diabetischen Retinopathie betrachtet, ergibt sich folgendes Bild (Abbild.1):

Patienten mit Diabetes, aber ohne Retinopathie, unterscheiden sich hinsichtlich der Urin-NAGA-Aktivität nicht von gesunden Kontrollpersonen. Patienten mit Retinopathie Stadium I haben gegenüber gesunden Kontrollpersonen sowie diabetischen Patienten ohne Retinopathie höhere Enzym-Aktivitäten. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant.
Noch höhere NAGA-Aktivitäten wiesen Patienten mit Retinopathie Stadium II bezw.Schweregrad III - IV auf.

3.3. Unterschiede der N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität bei Diabetikern mit verschiedenen Therapieformen

In Tabelle 5 sind die Resultate der NAGA-Aktivitätsmessung im Urin von Diabetikern dargestellt, eingeteilt nach Therapieformen.
Danach ergeben sich bei diabetischen Patienten, die mit oralen Antidiabetika eingestellt waren, deutlich und signifikant höhere NAGA-Aktivitäten gegenüber den allein diätetisch behandelten Patienten.Insulinpflichtige Diabetiker wiesen signifikant die höchsten NAGA-Aktivitäten auf.

3.4. N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität Diabetesdauer und Harnstoff-N

Eine Beziehung zwischen Dauer der Diabeteskrankheit und Urin-NAGA-Aktivität konnte, wie in Tabelle 6 zu sehen ist, nicht beobachtet werden. Ebenso konnte kein Unterschied in der Urin-NAGA-Aktivität von diabetischen Patienten gemessen werden, wenn das Patientenkollektiv nach Höhe der Harnstoff-N-Konzentration aufgeteilt wurde (Tabelle 7).

3.5. N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität in Beziehung zu den HbA_1-Werten

Die Messung des HbA_1 stellt ein Langzeitparameter der Kontrolle der Stoffwechsellage des Diabetikers dar. Es war deswegen von großem Interesse, zu prüfen, ob die NAGA-Aktivität im 24-Stunden-Urin von diabetischen Patienten mit der Höhe der HbA_1-Werte in Beziehung steht. Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, weisen Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus deutlich höhere NAGA-Aktivitäten im Urin auf. Wie in **Abbild.**2 dargestellt, erwies sich der Schweregrad der Retinopathie als unabhängig von der Höhe des aktuellen Blutzuckers.
Patienten mit Proteinurie wiesen eine geringgradig höhere NAGA-Aktivität im Urin auf (183 $\pm$ 55 nmol x h^{-1} x mg $Kreatinin^{-1}$) als diabetische Patienten ohne Proteinurie. Insgesamt wiesen in den von uns untersuchten Patientengruppen allerdings nur 5 Patienten eine Eiweißausscheidung auf. Deswegen konnten diese Befunde nicht auf statistische Signifikanz geprüft werden.

Wie schon in Tab.2 dargestellt, stand die Höhe der Urin-NAGA-Aktivitäten in keiner Beziehung zu den aktuellen Blutzuckerkonzentrationen. Etwas anders verhält es sich, wenn das HbA_1 als Langzeitparameter der Stoffwechsellage des Diabetikers zur NAGA-Urinaktivität in Beziehung gesetzt wird. Eine statistisch signifikante lineare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern wurde nicht beobachtet (Tab.2).
Wie aus Tab.8 ersichtlich ist, haben Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus (HbA_1, 10-12%) keine höheren Urin-NAGA Konzentrationen als Patienten mit HbA_1-Konzentrationen unter 10%. Patienten mit sehr schlecht eingestelltem Diabetes ($HbA_1 \geq 13\%$) wiesen hingegen deutlich und signifikant höhere Urin-NAGA Aktivitäten auf.

3.6. Schweregrad der diabetischen Retinopathie in Beziehung zu anderen Parametern

Der Schweregrad der diabetischen Retinopathie wurde zu einigen gemessenen Parametern in Beziehung gesetzt. So erwies sich der Schweregrad der Retinopathie als unabhängig von den aktuellen Blutzuckerkonzentrationen (Tab.9) sowie den gemessenen HbA_1-Werten (Tab.10). Wie in Tabelle 11 zu sehen ist, haben Patienten ohne Retinopathie eine wesentliche und statistisch signifikant kürzere Diabetesdauer als Patienten mit schwerer Retinopathie (Statium III und IV). Ein signifikanter Zusammenhang mit Serumkreatininwerten konnte nicht gefunden werden (Tab.12). Unsere Untersuchungen ergaben jedoch deutlich höhere Serumkreatininwerte bei Patienten mit Retinopathie Stadium III + IV gegenüber Patienten mit Retinopathie Stadium 0,I und II. Die diabetische Retinopathie erwies sich schließlich als unabhängig vom Alter der Patienten (Tab.13).

4. Diskussion

Diese Resultate liegen in Übereinstimmung mit denen der meisten anderen Untersucher, die die Beziehung von NAGA-Aktivität im Serum und Urin zum Diabetes mellitus (17,41,37, 4,30), insbesondere zur diabetischen Retinopathie untersucht haben (16). Auch wir fanden eine deutlich erhöhte NAGA-Aktivität im Urin von Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Stoffwechselgesunden.
Diese Unterschiede konnten durch Alter, Körpergewicht und Geschlechtsunterschiede nicht erklärt werden.

Über die Ursache der Erhöhung der NAGA-Aktivität im Urin und im Serum von diabetischen Patienten und deren Zusammenhang mit der Retinopathie kann nur spekuliert werden. Befriedigende Erklärungen werden auch von anderen Autoren nicht angeboten (4,5,6,8,9,30). Belfiore und Mitarbeiter (4) weisen darauf hin, daß die Erhöhung der Aktivität dieses Enzyms im Serum von diabetischen Patienten eine Folge der Einlagerungen von Mucopolysacchariden und Glycoproteinen in den Geweben und der dementsprechenden Aktivierung und vermehrten Exocytose von lysosomalen Enzymen sein könnte. Nach Meinung derselben Autoren könnte aber auch eine durch den Diabetes verursachte verminderte Stabilität der Lysosomen zu einer vermehrten Freisetzung von Enzymen führen. In einem solchen Fall würde es zu einer intrazellulären Verarmung an lysosomalen Enzymen kommen. Der Einlagerung von Mucopolysacchariden und Glycoproteinen und somit der Entstehung der diabetischen Mikroangiopathie wäre somit Vorschub geleistet. Im Tierexperiment wurden Befunde erhoben, die eine solche These stützen. Beim experimentell induzierten Diabetes mellitus ist die Aktivität in der Niere von Ratten vermindert, während im Serum erhöhte Aktivitäten gemessen wurden (18,23). In Organen, die von der diabetischen Mikroangiopathie nicht praeselektiv betroffen sind wie z.B. die Leber, wurden im gleichen Experiment keine Veränderungen der Enzymaktivität fest-

gestellt (18,23). Die Höhe der NAGA-Aktivität im Serum und Urin könnte somit ein Indikator für den Schweregrad der diabetischen Mikroangiopathie sein. Pitkänen und Mitarbeiter (30) veröffentlichten kürzlich, daß zwischen der im Urin gemessenen NAGA-Aktivität und dem Schweregrad der Retinopathie ein Korrelat besteht. Diese Resultate konnten in dieser Untersuchung bestätigt werden.

Von besonderem Interesse erscheint uns, daß bei normalem Fundus in keinem Fall erhöhte NAGA-Aktivitäten gemessen wurden, während bei einer Retinopathie Grad I - III in 50 - 60% der Fälle pathologisch hohe Werte ermittelt wurden. Wie aus früheren Untersuchungen bekannt, sind die NAGA-Aktivitäten, wie auch bei den von uns untersuchten Patienten, bei Patienten mit sehr schwerer Retinopathie (III - IV) geringgradig niedriger als bei Patienten mit Retinopathie-Grad I - II (30,14,33).

Diese Resultate zeigen, daß die NAGA-Aktivität im Urin von diabetischen Patienten als ein Indikator für das Bestehen einer Retinopathie gelten kann. Dementsprechend wäre zu erwarten, daß auch eine diabetische Nephropathie mit erhöhten Serum-und Urin-NAGA-Aktivitäten einhergeht. Als Parameter einer Nephropathie wurden in unserer Untersuchung die Serumkreatinin-und Harnstoff-N-Konzentration sowie die Proteinurie verwendet. Eine Beziehung der NAGA-Aktivität im Urin zur Serumkreatinin-und Harnstoff-N-Konzentration konnte nicht beobachtet werden. Allerdings scheint die Messung dieser beiden Parameter kein sehr sensibler Indikator einer Nierenschädigung zu sein,zumal sie auch durch andere Faktoren (wie z.B. den Hydratationszustand) beeinflußt wird.
Außerdem waren in der von uns untersuchten Gruppe nur wenige diabetische Patienten mit Niereninsuffizienz. Eine quantitativ signifikante Eiweißausscheidung fand sich nur bei

fünf Patienten. Diese wiesen geringgradig höhere NAGA-Aktivitäten im Urin auf, die jedoch wegen der geringen Anzahl nicht auf statistische Relevanz geprüft werden konnten. Hinweise auf Korrelationen NAGA:Kreatinin oder NAGA:Proteinurie bei diabetischen Patienten finden sich in den hier zitierten Arbeiten nicht.
Whiting und Mitarbeiter (39) weisen darauf hin, daß die erhöhte Urin-NAGA-Aktivität nicht nur durch Enzymaktivierung oder erhöhte Exocytose bei verminderter Stabilität der Lysosomen erklärt wurden. Diese Autoren vermuten, daß es in Folge einer Schädigung der Nierenzellen im Rahmen der diabetischen Mikroangiopathie zu einer Zellzerstörung kommen könne und lysosomale Enzyme, insbesondere die NAGA, in den Urin freigesetzt würden. Diese Theorie wird durch die Tatsache untermauert, daß eine erhöhte Enzymaktivität im Urin auch bei Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen beobachtet wurde (2,12,22,24,25,37). Eine Erhöhung der Urin-NAGA-Aktivität kündigt nach den Resultaten einer anderen Untersuchung die Abstoßung einer transplantierten Niere an (25). Auch in unseren Untersuchungen wurden bei Patienten mit Nierenerkrankungen die höchsten NAGA-Aktivitäten im Urin gemessen, vor allen Dingen extrem hohe Werte im Urin einer präterminalen Patientin mit Lupus Nephritis.

Über eine Abhängigkeit der NAGA-Aktivitäten im Serum und im Urin vom Blutzucker bei diabetischen Patienten wurde berichtet (4,22). Sehr hohe Enzymaktivitäten werden bei diabetischen Patienten mit entgleister Stoffwechsellage gefunden. Whiting et al. (39) und Belfore et al. (3) vermuten, daß es während Hyperglykämien zu einer Schädigung der Lysosomenmembran und damit verminderter Stabilität dieser Organzellen kommen kann. Dies wäre insbesondere der Fall, wenn über längere Zeiträume hohe Blutzuckerkonzentrationen bestehen. Blutzuckerkonzentrationen variieren bekanntlich bei diabetischen Patienten von Tag zu Tag.

Die Messung der Nüchternblutzuckerkonzentrationen stellt deshalb keinen sehr verlässlichen Parameter dar. Wir konnten keine Korrelation Blutzucker:Urin-Naga-Aktivität feststellen. Diese Korrelation ist auch bei den anderen Untersuchern nur gerade eben signifikant (4,29,20). Inzwischen hat sich die Messung des glycosilierten Haemoglobin HbA_1 als Langzeitkontrollparameter zur Beurteilung der Stoffwechsellage des Diabetes etabliert (19).
Untersuchungen der Abhängigkeit der Urin-NAGA-Aktivität von HbA_1 - Konzentrationen liegen in der Literatur noch nicht vor. In unserer Untersuchung konnte eine statistisch signifikante Korrelation nicht festgestellt werden. Allerdings wiesen Patienten mit sehr hohen HbA_1-Werten, d.h. schlecht eingestelltem Diabetes mellitus die höchsten Werte auf. Länger andauernde hohe Blutzuckerkonzentrationen scheinen demnach mit hohen NAGA-Urin-Aktivitäten assoziiert zu sein.
Ohne den pathophysiologischen Zusammenhang klären zu können, bestätigen diese Untersuchungen, daß eine enge Beziehung zwischen Retinopathie und der Aktivität des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase im Urin besteht. Diese Resultate sind in Einklang mit der Hypothese, daß lysosomale Enzyme in dem Entstehungsprozess der diabetischen Mikroangiopathie von Bedeutung sein könnten.

Die Frage, ob die NAGA-Aktivität nun eine Folge der Mikroangiopathie, oder die Mikroangiopathie eine Folge des Anstiegs der NAGA ist, bleibt jedoch auch nach unseren Untersuchungen offen.

5. Zusammenfassung

Bei der diabetischen Mikroangiopathie kommt es infolge einer Ansammlung von Glycoproteinen und Mucopolysacchariden zu einer Verdickung der kapillaren Basalmembran. Für den Abbau dieser Substanzen ist das lysosomale Enzym N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase mit verantwortlich, so daß eine verminderte Aktivität dieses Enzyms bei der Entstehung der diabetischen Mikroangiopathie von Bedeutung sein könnte.

In dieser Untersuchung wurde die N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase-Aktivität zu den Parametern Blutzuckerkonzentration, Serumkreatinin, Serum-Harnstoff-N, Eiweiß im 24 Std. Urin, HbA_1, sowie zu einer Klassifizierung der diabetischen Retinopathie in Beziehung gesetzt.

Untersucht wurden 61 Patienten verschiedener Altersgruppen, die wegen Diabetes mellitus in Behandlung waren, sowie 11 nierenkranke Patienten. Die Referenzwerte lieferten 21 nierengesunde, nicht an Diabetes mellitus erkrankte Probanten.

Zur Bestimmung der Aktivität der N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase wurde die fluorimetrische Methode von Dance et al. (11) verwendet.

Insgesamt war eine deutlich erhöhte Aktivität im Urin von Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Stoffwechselgesunden festzustellen, wobei die höchsten Aktivitätswerte von niereninsuffizienten Patienten stammten.

Eine positive, statistisch signifikante Korrelation bestand zwischen der Urin-NAGA-Aktivität und dem Schweregrad der diabetischen Retinopathie. Diabetische Patienten ohne Retinopathie wiesen in keinem Fall erhöhte Enzym-Aktivitäten auf. Mit den anderen untersuchten Parametern konnte keine statistisch signifikante Beziehung gefunden werden.

Diese Resultate bestätigen, daß zwischen der Aktivität des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase im Urin und dem Schweregrad der diabetischen Retinopathie ein Zusammenhang besteht. Hierdurch wird die Hypothese untermauert, daß lysosomale Enzyme bei der Entstehung der diabetischen Mikroangiopathie von Bedeutung sein können.

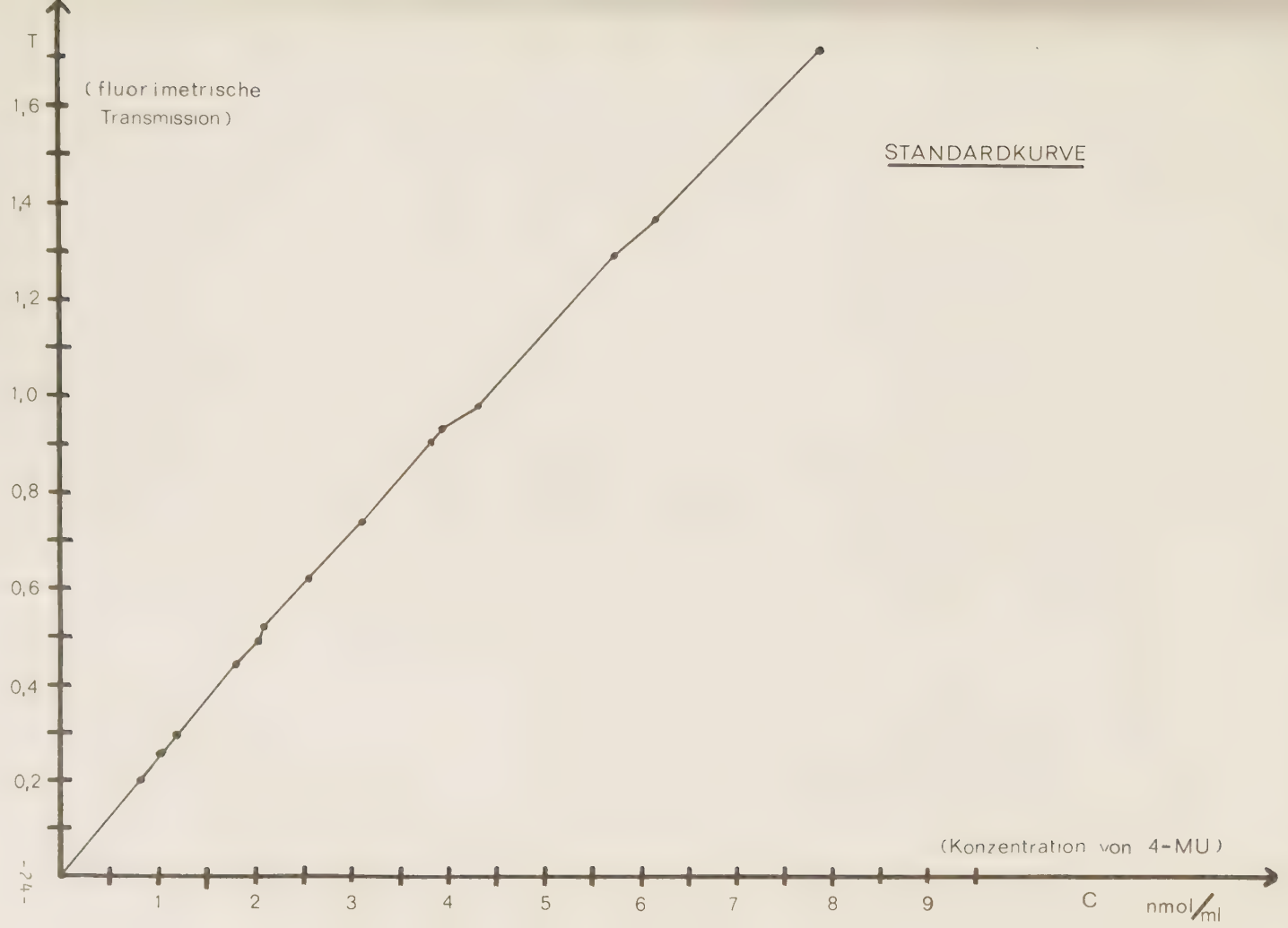

T
(fluorimetrische
Transmission)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
STANDARDKURVE
(Konzentration von 4-MU)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
C
nmol/ml

Tabelle I

Patientenverteilung

Patienten	n	Alter*
Diabetiker	61	61 ± 12
a) männlich	28	58 ± 13
b) weiblich	33	63 ± 11
Gesunde	21	43 ± 16
a) männlich	15	43 ± 17
b) weiblich	6	44 ± 16
Nierenkranke	11	57 ± 16
a) männlich	7	61 ± 16
b) weiblich	4	47 ± 25

* Keine statistisch signifikante Differenz zwischen den verschiedenen Gruppen

Tabelle 2

NAGA-Aktivität im 24-Stunden-Urin von Normalpersonen, Diabetikern und Patienten mit Niereninsuffizienz.

NAGA-Aktivität ist in $nmol \times h^{-1} \times mg\ Kreatinin^{-1}$ angegeben.

Der Unterschied zwischen NAGA-Aktivität im Urin von diabetischen Patienten gegenüber Gesunden ist signifikant ($p<0,002$).
Signifikant ist auch der Unterschied zwischen Nierenkranken und Gesunden ($p<0,001$) und Nierenkranken und Diabetikern ($p<0,001$).

Patienten	n	x	SEM
Gesunde:	21	75,9	8,8
a) weibliche	5	92,8	6,2
b) männliche	15	72,0	11,7
Diabetiker	51	161,1	24,8
a) weibliche	27	185,3	38,7
b) männliche	24	132,6	36,2
Patienten mit Niereninsuffizienz	10	900,6	522,2

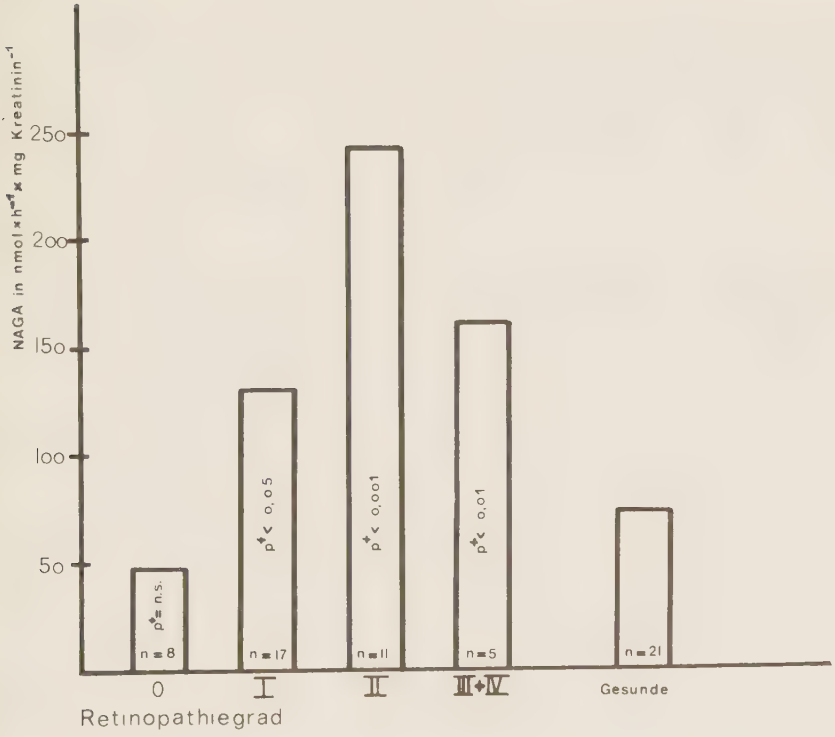
Tabelle 3

Korrelation zwischen NAGA-Aktivität und den anderen geprüften Parametern in unserem Patientenkollektiv

	n	r	P
NAGA - Retinopathie	42	0,353	<0,01
NAGA - Blutzucker	47	- 0,198	n.s.
NAGA - Serumharnstoff-N	36	- 0,025	n.s.
NAGA - Serumkreatinin	81	- 0,064	n.s.
NAGA - Diabetesdauer	58	- 0,095	n.s.
NAGA - HbA_1	39	0,19	n.s.
NAGA - Lebensalter	83	0,152	n.s.

Abbildung 1

NAGA – Abhängigkeit vom Schweregrad der Retinopathie bei Patienten mit Diabetes mellitus



SEM bei Retinopathiegrad: 0 = 5,2
I = 23,1
II = 21,9
III+IV = 17,9

SEM bei Gesunden: = 8,8

p^+: p gegenüber Gesunden

Tabelle 5

Urin-NAGA-Aktivität bei Diabetikern mit und ohne Insulin-Therapie

NAGA in $nmol \times h^{-1} \times mg\ Kreatinin^{-1}$

Diabetiker	n	x	SEM	p (gegenüber diätetisch eingest.)
diätetisch eingestellt	19	84,6	12,56	-
tablettenpflichtig	15	184,1	54,1	$<0,05$
insulinpflichtig	12	259,9	68,4	$<0,05$

Tabelle 6

NAGA-Aktivität in Abhängigkeit von der Diabetesdauer

NAGA in $nmol \times h^{-1} \times mg\ Kreatinin^{-1}$

Dauer (Jahre)	n	x(NAGA)	SEM
1 - 5	10	141,2	24,8
5 - 15	15	141,3	29,2
mehr als 15	16	125,3	32,1

Tabelle 7

NAGA-Aktivität im 24-Stunden-Urin von Diabetikern

Abhängigkeit von Serum-Harnstoff-N Werten

NAGA in $nmol \times h^{-1} \times mg\ Kreatinin^{-1}$

Harnstoff N	n	x (NAGA)	SEM
15 mg/dl	12	111,5	20,2
15 - 2o mg/dl	12	131,5	24,4
20 mg/dl	11	146,6	44,7

Tabelle 8

NAGA-Aktivität im 24-Stunden-Urin von Diabetikern

Korrelation von der HbA_1 Konzentration

NAGA in $nmol \times h^{-1} \times mg\ Kreatinin^{-1}$

HbA_1-Einteilung	n	x (NAGA)	SEM	P
kleiner 10%	12	119,4	21,9	
10% - 13%	21	123,3	24,4	n.s.
größer 13%	6	204,2	58,4	<0,01

Abbildung **2**

Die Beziehung der Retinopathie zur Höhe des aktuellen Blutzuckers

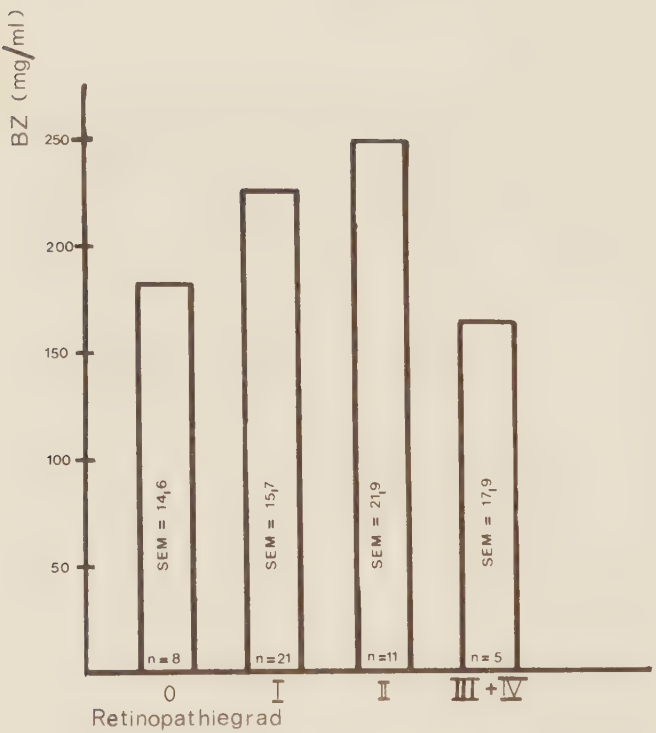


Tabelle 10

Beziehung der Retinopathie zu den HbA_1-Werten

Retinopathiegrad	HbA_1			
	n	x	SD	SEM
0	7	9,5	1,2	0,?
I	15	11,0	1,6	0,3
II	9	11,?	?,?	0,7
III + IV	5	12,4	1,5	0,2
II + III + IV	14	11,6	2,0	0,5

Tabelle 11

Retinopathie:

Beziehung zur Diabetesdauer

Retinopathie		(Diabetesdauer in Jahren)		
	n	x	SD	SEM
0	8	5,7	2,8	0,9
I	17	9,9	6,6	1,4
II	11	14,1	2,8	0,9
III + IV	5	17,6	9,2	3,7
II + III + IV	16	15,6	6,3	1,7

Tabelle 12

Retinopathie:

Beziehung zu den Serumkreatininwerten

Retinopathiegrad	(Serumkreatinin in mg/dl)			
	n	x	SD	SEM
0	7	0,93	0,221	0,04
I	15	1,0	0,237	0,05
II	12	1,108	0,227	0,06
III + IV	5	1,680	0,931	0,41
II + III + IV	17	1,356	0,480	0,12

Tabelle 13

Retinopathie:

Beziehung zum Alter

Retinopathiegrad	Alter in Jahren			
	n	x	SD	SEM
I	15	63	11	2,3
II	13	65,3	9,0	2,5
III + IV	6	43,8	11,7	4,7
II + III + IV	19	58,5	14,1	3,2

Gesamtaufstellung der gemessenen Werte bei allen Patienten

* D = Diät
T = orale Antidiabetika
J = Insulin

Patienten	Alter	Geschlecht	Serum-kreatinin	SHN	BZ	Urinmenge in 24 Std.	HbA_1 %	Glucose (g)	Diabetesdauer (Jahre)	Retionpathie	Diabetes Einstellung *	Kreatin mg %	Δ T	NAGA nmol/ml	nmol/h / mg kreat	nmol/h / Urinmenge
1	69	w	1,2	15	170	1520	9,6	0	27	I	T	46	0,079	3	65,21	9 120
2	79	m	1,2	13	118	1800	7,6	0	16	0	T	34	0,130	5	147,05	18 000
3	77	w	1,0	28	170	1600	12,8	11	25	I	T	112	o,960	39,5	352,67	126 400
4	62	w	1,8	7	228	1250	14,0	5	2,5	I	D	62	0,236	9,5	153,22	23 750
5	80	m	1,2	24	280	1700	12,2	20,4	17	II	T	58	0,193	7,9	136,20	26 860
6	73	w	0,9	17	190	1500	9,4	0	10	I	T	58	0,336	14	241,37	42 000
7	42	m	1,0	13	146		11,3	0	3	III	T	243	0,434	15,3	63,22	
8	61	m	1,2	15	220	1200	12,6	0	14	0	D	78	0,051	3,5	44,87	8 400
9	60	w	0,7	19	190	1500	14	45	17	I	T	244	0,374	15,2	62,29	45 600
10	72	w	1,0	17	155	900	11	0	3	I	T	68	0,482	20	294,11	36 000
11	46	m	1,6	18	144		12	0	5	II	T	72	1,488	61,4	852,77	
12	69	w	1,4	26	190	1400	10,9	0	15	II	T	142	0,231	9,5	66,90	26 600
13	59	w	1,0	18	230		11	11	7	II	J	74	1,559	64,5	871,62	
14	59	m	1,0	19	145	1150	12,2	0	15	III	J	128	0,239	9,5	74,21	21 850
15	73	w	0,9	15	262	1500	10,9	39	10	I	T	100	0,513	11	110,00	33 000
16	68	m	1,1	17	186	1300	10,1	0	16	I	T	140	0,383	18	128,50	46 800
17	65	w	0,8	20	270	2000	11,7	50	14	I	J	67	0,698	139,6	465,33	135 500

18	55	m	1,0	23	280	1300	10,7	35	31	III	J		2,350	98			64 500
19	58	m	1,0	19	226	900	12,5	43	10	II	T	76	1,425	59,2	142,63		36 720
20	66	w	1,0	27	194	2400	7,7	9,6	12	0	D	69	0,581	24,4	70,72		33 760
21	65	w	0,8	20	238		11,7	0	14	II	J	66	1,775	76,5	231,81		
22	67	w	0,6	18	259	1400	13,1	41	3	I	J		1,944	80,6			75 560
23	49	m	1,3	9	250	1750	9,1	5	9	I	T	78,6	2,050	85,2	218,46		93 700
24	76	m	1,5	28	220	1850	11,2	4,4	4	I	T	84,29	1,774	73	173		91 600
25	62	w	1,1	17	150	1660	12,6	72	10	I	J	88,1	1,849	76	172		75 680
26	65	m	1,2	33	350	3100	11,9	52	13	I	J	51,6	0,49	19,6	37,64		39 800
27	49	m	1,3	10	200	1750	8,9	3	9	I	T	88,3	1,225	50	113,63		66 000
28	66	w	1,0	27	194		7,7	10	12	I	J	57,7	1,305	18,5	64,91		
29	53	m	1,1	13	240	1900	11,6	19,8	16	I	J	107	1,694	70	130,84		79 400
30	46	m	0,9	19	100	1750	9,3	4,3	3	I	J	72,2	1,437	59,5	151,3		60 750
31	58	m	1,0	19	140	1400	7,7	29	10	II	T	80	0,949	39,1	160,7		58 400
32	40	m	1,0	15	346	3000	14	187	1	I	J	58	1,075	44	151,7		88 300
33	68	w	1,1	19	340	1580	7,4	0	17	II	T	97,3	0,813	33	68		37 988
34	68	w	1,1	19	110	1520	13,1	13	17	II	T	98	1,027	42	74		45 320
35	33	m	1,2	13	280	3100	8,8	33	1	I	J	100	0,801	15,5	67		80 430
36	40	m	1,0	15	400	2800	13,3	185	1	0	J	57,4	0,639	26	91,52		52 300
37	50	m	1,2	15	313	1275	11,3	14,8	1	0	J	276,4	1,175	48	34,78		29 500
38	67	w	0,6	18	238	1700	9,5	48,2	3	I	T	31,6	0,745	34,5	222,5		39 800
39	68	w	1,1	19	210	3000	10,2	36	19	0	T	37,6	0,273	11	59,4		66 000
40	73	m	1,4	27	260	1500	13,2	63	7	I	T	40	0,237	9,5	62,4		28 500

41	63	m	1,0	28	185	2300	10,9	0	16	I	T	43	0,151	6	40,9	27 600
42	61	w	0,6	11	195	1750	9,2	7	2	I	D	57	0,522	21,5	76,7	75 250
43	80	m	1,2	24	280	1700	12,2	20,4	14	II	T	58	0,193	8	27,6	27 200
44	74	w	1,0	18	440	1500	10	30	16	I	T	79,2	0,295	12	30,37	36 000
45	72	w	1,1	26	282	1750	8,6	0	16	0	D	87	0,282	11,5	26,74	40 250
46	73	w	1,5	15	218	1400	9	0	14	0	D	77,4	0,769	31,7	82,4	88 760
47	58	m	1,6	19	217	3500	11,1	28	6	0	T	118	0,685	28,4	48,13	198 800
48	69	w	1,4	16	340	1700	12	55	7	0	D	89	0,515	21,5	48,31	73 100
49	66	w	1,2	25	320	1050	14	48	16	II	T	97	0,720	29,7	60,3	62 370
50	74	m	1,3	20	197	1750	10,5	7	17	I	D	67	0,196	8	24,24	28 000
51	45	m	1,0	12	380	2000	13,5	95	1	0	T	66	0,482	20	90,7	80 000
52	68	w	1,4	19	299	1750	11	31	2	II	D	67	0,324	13,2	50,8	46 200
53	70	m	1,2	22	134	3100	12	0	25	0	T	66	0,520	21	63,7	40 800
54	45	w	1,2	14	235	3650	14	2	15	III	T	89	0,347	14	31,4	61 600
55	45	w	1,2	19	225	2000	12	4	15	III	T	50	0,388	16	69,4	64 000
56	31	w	1,6	25	174	2150	16	2,5	21	IV	D	42,7	1,879	79	376	339 700
57	71	m	1,5	20	210	3650	20	2	25	0	T	61,8	0,421	16,2	53,11	38 630
58	31	w	2,7	26	120	2600	14,1	3,6	21	IV	D	43,7	2,024	84	390,7	142 400
59	50	w	1,6	17	262	2000	12,5	100	17	0	I	42	0,239	9,5	45,23	38 000
60	65	w	0,9	17	90		14,2	10	12	0	D	143	0,831	34	171	
61	77	w	1,1	18	110		13,9	0	5	0	D	40	0,391	16,4	235	

Kontrollpersonen ohne Niereninsuffizienz oder Diabetes

Patienten	Alter	Geschlecht	Serum-kreatinin	SHN	BZ	Urinmenge in 24 Std.	Kreatin mg %	Δ T	NAGA nmol/ml	nmol/h / mg Kreat.	nmol/h / Urinmenge
62	25	w				1150	101	0,197	8,2	81,18	18 696
63	25	m				800	228	0,177	7,2	31,57	11 520
64	25	m				940	152	0,180	8	52,6	15 040
65	27	m				1000	234	0,158	6,7	28,7	13 440
66	25	w				2000	60	0,115	5	83,6	20 000
67	57	w				1400	56	0,105	4,9	87,5	13 720
68	57	m				1600	153	0,151	6,7	43,8	21 440
69	25	m				1050	209	0,169	7,5	35,9	15 750
70	32	m				1000	71	0,126	5	40,7	14 320
71	25	m				1200	171	0,203	8,7	50,8	20 880
72	54	w	2,8	50	70		105	0,364	15	102	
73	74	m	1,2	20	64		0,88	0,556	23	188	
74	68	m	1,6	22	80		117,2	0,360	15	84,4	
75	41	m	0,9	20	110		2,74	0,541	22,5	59	
76	44	m	1,0	12	74		0,91	0,440	18,5	146	
77	63	w	1,2	19	82		104	0,285	12	115	
78	43	m	1,1	18	90		1,17	0,459	19	116	
79	43	m	1,2	16	101		1,33	0,162	7,5	40,6	
80	70	m	1,5	16	97		0,71	0,139	6	60,84	
81	50	m	1,2	13	97		0,7	0,155	7	72	
82	66	m	1,1	22	80		2,19	0,203	8,7	39,7	

Literaturverzeichnis

1. D.Adlersberg, L.E.Schaefer, A.G.Steinberg, C.I.Wang:
Age, sex serum lipids, and coronary atherosclerosis.
Jama (1956), 62: 619-622

2. D.Andreani, U. DiMario, M. Lavicoli, P. Pozzilli, B. Lumbrosco, U. Guy, W.J. Irvine:
Immune complexes and diabetic retinopathy
Diabetologia (1978) 15: 215-218

3. A.J. Ballentyne, A.Loewenstein:
Pathology of diabetic retinopathy.
Trans. ophthal. Soc. U.K. (1943) 63: 95-95

4. F. Belfiore, F. Napoli und L.L. Vecchio:
Serum N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in diabetic patients
Diabetes (1972) 21: 1168-1172

5. F. Belfiore, L.L.Vecchio, F. Napoli:
Serum enzymes in diabetes mellitus.
Clin. chem. (1972) 19: 447-451

6. F.Belfiore, L.L. Vecchio, F. Napoli:
Serum glucoronidase activity in diabetic patients.
Am. J. Med. Sc. (1972) 457-465

7. J.Berkmann, H. Rifkin und G. Ross:
The serum polysaccharides in diabetic patients with and without degenerative vascular disease.
J. Clin. Invest. (1953) 32: 415-421

8. F.M. Bomback, S. Nakagawa, S. Kumin, H.M. Nitowsky:
Altered lysosomal glycohydrolase activities in juvenile diabetes mellitus.
Diabetes (1976) 25: 420-427

9. L.J. Borthwick, P.H. Whiting:
Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase in diabetes mellitus.
Diabetologia (1978) 15: 221

10. J. Conchie, J. Findly und G.A. Levvy:
Mammalian Glycosidases.
Biochem. J. (1959) 71: 318

11. N. Dance, R.G. Price, R.D. Robinson and J.C. Shirling:
Beta-galactosidase, beta-glucosidase and N-acetyl-beta-glucosidase in humàn kidney.
Clin. Chim. Acta (1969) 24: 189-197

12. N. Dance, R.G.Price, W.R.Cattell, J. Landsell, und B. Richards:
The excretion of N-acetyl-beta-glucosaminidase and beta-galactosidase by patients with renal disease.
Clin. Chim. Acta (1970) 27: 87-92

13. R. Dohrmann:
Die beta-Glucoronidaseaktivität im Serum bei einigen inneren Krankheiten.
Z. Ges. Exp. Med. (1960) 132: 585-593

14. J.S. Friedenwald:
Diabetic retinopathy.
Am. J. Ophthal. (1950) 33: 1187-1199

15. M. Fushimi, S. Tarui:
Kidney and serum N-acetylglucosaminidase activities in streptozotocin diabetic rats and their responses to insulin and glucagon.
J. Biochem. (1974) 76: 225-227

16. M. M. Fushimi, S. Tarui:
Retina, tear and serum beta-acetylglucosaminidase activities in diabetic patients
Clin. Chim. Acta (1976) 71: 1-8

17. M.Fushimi, K. Ischihara, S. Tarui, M. Nishikawa:
Increase of urinary and tissus hexosamine in streptozotocin diabetic rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1974) 145: 302-304

18. M. Fushimi, S. Tarui:
Beta-glucosidases and diabetic corangiopathy I. Decreases of beta-glucosidase activity in diabetic rat kidney.
J. Biochem. (Tokyo 1976) 79: 265-270

19. F. D. Goebel, H. Füeßl:
Klinische Relevanz der Aldimin-Form der glycosilierten Hämoglobine bei raschen Blutzuckerschwankungen.
Ärztl. Labor (1983) 29:23

20. L. Hagenfeldt, F. Wahlberg:
Serum beta-glucoronidase, glucose tolerance, and artheriosklerotic disease.
Lancet (1965) I: 788

21. L. J. Holland, R.H. Felix, W.C. Alston:
Serum N-acetyl-beta-glucosaminidase and circulating immune complex activity in systemic lupus erythematosus.
Br. Med. J. (1978) I: 1027

22. B. Hultberg, N. Norden und P.A. Öckermann:
Urinary excretion of acid hydrolases in disease.
Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 1972, 30:214-216

23. D. Juretic, K. Lipovac, M. Hadzija and M. Slijepcevic:
Activities of glycosidases in diabetic rats.
Diabetologia (1978) 15: 213-216

24. M.A. Mansell, M.F. Jones, P.N. Ziroyannis und W.S. Marson:

N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase: A new approach to the screening of hypertensive patients for renal disease.
The lancet (1978), Oktober 14: 803-805

25. A. Mansell, F. Jones, N. Ziroyannis und T.S.M. Tucker:
Detecting of renal artery stenosis by measuring urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase
British Med. J. (18. Feb. 1978) 414-415

26. B. Miller, F.P. Keyes und P.W. Curreri:
Increase of serum beta-glucuronidase activity in human diabetes mellitus.
J. Am. Med. Assoc. (1966) Vol 195 Nr.3: 127-130

27. B.F. Miller, F.P. Keyes und P.W.Curreri:
Serum beta-glucuronidase activity of various spezies. Possible correlation with susceptibility of arterosclerosis.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (1965) 119: 1129-1133

28. R.E. Noble, J.S. Najarian and H.D.Brainerd:
Urine and serum lysozyme measurement in renal homotransplantation.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (1965) 120: 737

29. R.S. Patrick and F. Walker:
The glucosamine content of human umbilical cord jelly in normal and diabetic pregnancy.
Diabetologia (1969) 5, 29-33

30. E. Pitkänen, M. Kyllästinen, T. Koivula and P. Hormila:
Beta-N-acetylglucosaminidase and beta-glucoronidase activites in insulin-dependent diabetic subjects with retinopathy.
Diabetologia (1980) 18: 275-278

31. R.G. Price, N. Dance, B. Richards and W.R. Cattell:
The excretion of N-Acetyl-beta-glucosaminidase and beta-galactosidase following surgery of the kidney.
Clin.Chim.Acta (1970) 27: 65-72

32. D. Robinson:
Survey of coronary care facilities in 50 Massachusetts hospitals.
7th International Congress of Clinical Chemistry (1970) Vol 1, p 42. Basel, Karger

33. F.G. Spiro:
Role of insulin in two pathways of glucose metabolism: in vivo glucosamine and glycogen synthesis
N.Y.Acad. Sci. (1959) 82: 366-373

4. S.M. Tucker, P.J.R. Boyd, A.E. Thompson and R.G. Price:
Automated assay of N-acetyl-beta-glucosaminidase in normal and pathological human urin.
Clin. Chim. Acta (1975) 62: 333-339

35. Test Combination Creatinin Best.Nr. 124 192
Boehringer Mannheim GmbH.

36. F. Walker and R.S. Patrick:
Effect of insulin on the hexosamine content of alloxan diabetic rabbit vitreous humor.
Diabetes (1968) 17: 105-107

37. J.M. Wellwood, B.G. Ellis, R.G. Price, K. Hammond, A.E. Thompson and N.F. Jones: Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase Activities in patients with renal disease. British Medical Journal (1975) 3: 408-411

38. J.M. Wellwood, B.G. Ellis, J.H. Hall, D.R. Robinson and A.E. Thompson: Early warning of rejection? British Medical Journal (1973) 2: 261-265

39. H. Whiting, I.S. Ross and L. Borthwick: Serum and urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in diabetics on diagnosis and subsequent treatment and stable insulin dependent diabetics. Clin. Chim. Acta (1979) 92: 459-463.

40. J.W. Woolen and P. Turner: Plasma N-acetyl-beta-glucosaminidase and beta-glucuronidase in health and disease. Clin. Chim. Acta (1965) 12: 671-683

41. J.W. Woolen and P. Turner: Serum beta-glucuronidase, glucose tolerance, and atherosclerotic disease. The Lancet (1965) 1071-1072

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und
die stete Unterstützung möchte ich
Herrn Prof. Dr. N. Zöllner und
Herrn Prof. Dr. F.D. Goebel, sowie
Herrn Dr. K. Henze
herzlich danken.

Lebenslauf

Rainer Assfalg, geb. am 11.2.1956 in Ingerkingen Krs. Biberach als Sohn des Ekkehard Assfalg und seiner Ehefrau Imelda, geb. Schneider.

1960 - 1964	Kindergarten Christkönig in Ravensburg
1964 - 1969	Grundschule Neu-Wiesen in Ravensburg
1969 - 1975	Besuch des neusprachlichen Gymnasiums Albert-Einstein in Ravensburg
1975	Wechsel ins neusprachliche Welfen-gymnasium in Ravensburg
1977	Abitur am Welfen-Gymnasium Ravensburg
1977 - 1983	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München